

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. MI2003 A 001617



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 7 MAG. 2004

IL FUNZIONARIO

Paola Giuliano
D.ssa Paola Giuliano

Rest Available Copy

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO

10,33 Euro

A. RICHIEDENTE (1)

1) Denominazione FONDAZIONE CARLO E DIRCE CALLERIO ONLUS
 Residenza TRIESTE/IT codice 1009426
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza NOTARBARTOLO & FERVASI S.p.A.
 via C.so di Porta Vittoria n. 19 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

Microcapsule a doppio strato di polisaccaridi utilizzabili come veicoli per la
somministrazione orale di sostanze biologicamente attive

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____/_____/_____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) SAVA Gianni 3) VOJNOVIC Dario
 2) ZORZIN Laura 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) <u>nessuna</u>	_____	_____	____/____/____	_____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	<input checked="" type="checkbox"/> PROV	n. pag. <u>40</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	<input checked="" type="checkbox"/> PROV	n. tav. <u>103</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		lettera d'incarico, procura o provvedimento procura generale
Doc. 4)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		designazione inventore
Doc. 5)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<input checked="" type="checkbox"/> RIS		nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale Euro

Duecentonovantuno/80

COMPILATO IL 06/09/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego Pallini

obbligatorio

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 001617

Reg. A

codice 155

L'anno DUEMILATRE

SEI

, del mese di AGOSTO

Il(I) richiedente(i) sopralindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto per invenzione industriale, depositata in n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

IL RAPPRESENTANTE DELL'UFFICIALE ROGANTE È INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N.423 DEL 01/03/2001 E SOTTOSCRIVE IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA DI INCARICO

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

G. SURACI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2003A 001617

REG. A

DATA DI DEPOSITO

06 08 2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

A. TITOLO

Microcapsule a doppio strato di polisaccaridi utilizzabili come
veicoli per la somministrazione orale di sostanze biologicamente
attive

L. RIASSUNTO

La presente invenzione e' relativa a microcapsule a doppio strato di polisaccaridi naturali-chitosano e alginato-gelificate e stabilizzate per mezzo di uno ione divalente contenenti al proprio interno almeno una sostanza biologicamente attiva. Le microcapsule dell'invenzione possono essere impiegate come veicoli per la somministrazione orale di sostanze biologicamente attive, anche associate a un adiuvante la risposta biologica delle stesse, somministrate a scopo preventivo o terapeutico. Tali sostanze possono essere scelte, ad esempio, tra antigeni e adiuvanti in grado di stimolare la risposta immune contro agenti infettivi o non infettivi, oppure tra chemioterapici e adiuvanti con effetti di tipo terapeutico. A seconda del tipo di sostanze biologicamente attive inglobate nelle microcapsule ci potranno essere diversi utilizzi per la vaccinazione o per la terapia per via orale in campo umano e veterinario.

M. DISEGNO



Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

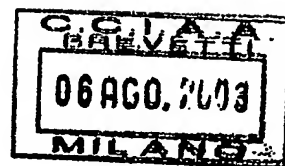
"MICROCAPSULE A DOPPIO STRATO DI POLISACCARIDI
UTILIZZABILI COME VEICOLI PER LA SOMMINISTRAZIONE ORALE
DI SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVE"

a nome di: FONDAZIONE CARLO E DIRCE CALLERIO ONLUS

residente a: TRIESTE / IT

inventori designati: SAVA Gianni, ZORZIN Laura, VOJNOVIC Dario

M 2003A00161Z



CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione è relativa a microcapsule a doppio strato di chitosano ed alginato gelificate e stabilizzate con uno ione divalente, incorporanti almeno una sostanza biologicamente attiva, utilmente impiegabili a scopi vaccinogeni o terapeutici per via orale in campo umano e veterinario.

STATO DELLA TECNICA

Allo scopo di veicolare in modo efficace per via orale agenti terapeutici, come ad esempio proteine o peptidi, comunemente somministrabili solo per via parenterale, da tempo la ricerca si è indirizzata verso la preparazione di microcapsule in grado di inglobare e rilasciare in modo controllato tali agenti.

Tra i polimeri impiegabili per preparare microcapsule, i polisaccaridi naturali come amido, κ -carragenano, alginato, agar, agarosio, destrano e chitosano risultano particolarmente interessanti per le loro proprietà chimico-fisiche e per la loro elevata biocompatibilità e biodegradabilità. I polisaccaridi sono infatti polimeri non tossici che possono formare strutture geliformi, in cui è possibile inglobare agenti terapeutici, o

comunque biologicamente attivi, anche ad elevato peso molecolare. Inoltre è noto che i polisaccaridi possiedono proprietà bioadesive, caratteristica questa particolarmente importante per un assorbimento terapeutamente efficace attraverso la mucosa gastrica o intestinale dei principi attivi inglobati.

Sia il chitosano che l'alginato da soli o in combinazione tra loro o con altri polimeri sono stati studiati per l'incapsulazione di proteine, in quanto in ambiente acquoso possono gelificare e formare microcapsule. Tale processo, per l'alginato, risulta favorito dalla presenza di ioni divalenti ed in particolare ioni calcio.

Polk. A. et al. (1994 *J. Pharm. Sci.*, 83:178-185) descrive la preparazione di microcapsule contenenti albumina con differenti concentrazioni di acido alginico (da 1.5 a 2.5 % p/v), chitosano (da 0.1 a 0.4% p/v) e calcio cloruro (1.5% p/p) ottenendo microcapsule con un diametro di circa 250 μ m allo stato secco e ne studia le caratteristiche chimico-fisiche e di rilascio dell'albumina.

Più recentemente Vandenberg G.W. et al. (2001 *J. Control. Release* 77: 297-307) ha studiato l'influenza di diversi fattori sul rilascio di albumina da coacervati di alginato e chitosano, gelificati con calcio cloruro, in condizioni basali, a pH acido (1.5) e neutro (7.5), allo scopo di identificare le condizioni ottimali per la messa a punto di un sistema di incapsulazione per la veicolazione di proteine. Il protocollo standard per l'incapsulazione dell'albumina era: una soluzione acquosa di alginato al 2 % p/v, a cui era aggiunto il 25 % (massa di proteina : massa di alginato) di albumina, era estrusa in una soluzione di chitosano al 2 % p/v in acido

acetico, la cui soluzione era portata a pH 5.5 ed a cui era aggiunto calcio cloruro all'1.5 % p/v. I diversi fattori studiati rispetto a questo protocollo di incapsulazione erano: i) differenti percentuali di caricamento della proteina (25, 50, 75, 100 % massa di proteina: massa di alginato p/p); ii) diversi pH (3, 4, 5, 6) del mezzo durante l'incapsulazione oppure iii) concentrazioni variabili dei tre componenti. In particolare, in quest'ultima condizione la ritenzione della proteina è stata provata in concentrazioni comprese tra 1.0 e 3.0 (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0) % p/v di alginato, da 0 a 0.75 % (0, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.75) p/v di chitosano e da 0.05 a 5 (0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 5) % p/v di CaCl_2 . I dati sperimentali indicano che la concentrazione ottimale dell'alginato per l'inglobamento della proteina è il 2 %, mentre la ritenzione della stessa a pH acido raggiunge il massimo alla concentrazione di alginato del 2.5 %. Per il chitosano le concentrazioni migliori risultano essere 0.125 % per l'incapsulamento e 0.25 % per la ritenzione della proteina a pH acido, mentre la variazione delle concentrazioni di calcio non sembrano significative per influenzare i due parametri considerati, risultando che per il calcio la concentrazione migliore per entrambi i parametri è lo 0.5 %. Il caricamento della proteina più idoneo risulta essere al 25 %. È comunque importante osservare che in ambiente acido in condizioni che simulano le condizioni gastriche con le microcapsule descritte si ha sempre un significativo rilascio della proteina, mentre in condizioni neutre questo non sembra influenzato.

Per la messa a punto di efficaci sistemi di veicolazione per via orale di sostanze biologicamente attive, particolare attenzione va riservata al rilascio a livello intestinale. L'assorbimento intestinale può essere infatti



preferito per sostanze facilmente degradabili in ambiente acido o per sostanze in grado di produrre una risposta immune, rilascio che, associato alla capacità di aderire alla mucosa delle microcapsule impiegate per la veicolazione di dette sostanze, può determinare un significativo incremento della risposta. In questo ultimo caso è noto infatti che la mucosa intestinale presenta un elevato numero di cellule linfoidi che sono in grado di produrre un'efficiente risposta immunitaria agli stimoli infettivi esterni (*Van der Lubben I.M. et al., 2001 Adv. Drug. Del. Rev. 52: 139-144; Schep L.J. et al., 1999 J. Contr. Release, 59: 1-14*).

Questo processo non sembra però essere una peculiarità confinata ai soli mammiferi. Infatti, ad esempio, la letteratura riporta interessanti dati in tal senso nei pesci, anche se l'esatta natura della risposta immunitaria sistemica in seguito a somministrazione orale nei pesci non è ancora totalmente compresa. Sistemi di rilascio orale, adatti a proteggere l'antigene nello stomaco del pesce e a permetterne la captazione a livello intestinale, dove può essere processato dalle cellule competenti, sono in grado di evocare una risposta immunitaria protettiva (*Schep L.J., et al. 1999 ref. cit.*). Riguardo la risposta immunitaria locale è stato visto che il secondo segmento dell'intestino terminale dei pesci è capace di assorbire antigeni solubili o particellari (*Schep L.J., et al 1999 ref. cit.*). Ed ancora anticorpi specifici sono stati ritrovati in diverse specie ittiche vaccinate oralmente quali: trote, branzini, pesci gatto e passerini (*Ainsworth AJ et al. 1995 J. Fish Disease 18 (5): 397- 409*).

Allo scopo di ottenere sistemi efficienti per l'assorbimento intestinale a seguito della somministrazione per via orale è quindi necessario che: i) le

microcapsule inglobanti le sostanze biologicamente attive non vengano significativamente degradate in ambiente acido a livello gastrico proteggendo le stesse dalla degradazione e che le stesse non siano significativamente rilasciate in ambiente acido, permettendone così l'arrivo nell'intestino; ii) la superficie esterna delle microcapsule abbia buone capacità bioadesive in modo da aderire alla mucosa intestinale e rilasciare in modo controllato le sostanze biologicamente attive inglobate.

Le microcapsule devono inoltre inglobare una o più sostanze in modo da indurre una sufficiente risposta biologica ed avere una dimensione molto ridotta ($<10\mu\text{m}$) in modo da potere essere captate dalle placche del Peyer. La captazione da parte delle placche del Peyer è particolarmente importante nel caso in cui le sostanze biologicamente attive siano antigeni somministrati allo scopo di indurre una risposta immunitaria.

È inoltre importante che il sistema di veicolazione per via orale nel suo insieme sia di facile somministrazione e realizzazione industriale e di costi contenuti.

Benché gli studi fatti sul rilascio da coacervati di alginato e chitosano da Vandenberg G.W. et al. (*ref. cit.*) siano di sicuro interesse, le microcapsule descritte non sembrano possedere le caratteristiche necessarie per la messa a punto di un sistema di veicolazione per via orale con le caratteristiche sopra dette, in relazione al fatto che il rilascio della proteina inglobata — nello specifico albumina — avviene essenzialmente a pH acido.

SOMMARIO

Lo scopo è quello di sviluppare un nuovo sistema di somministrazione

per via orale di sostanze biologicamente attive, in grado di determinare un assorbimento essenzialmente a livello intestinale, in microcapsule di polisaccaridi naturali che abbiano le caratteristiche di: i) inglobare almeno una sostanza biologicamente attiva in modo che venga protetta dalla degradazione in ambiente acido a livello gastrico; ii) permettere il rilascio della stessa a livello dell'intestino; iii) avere buone capacità bioadesive in modo da aderire alla mucosa intestinale e rilasciare in modo controllato la stessa; iv) avere una dimensione molto ridotta in modo da potere essere captate dalle placche del Peyer, particolarmente nel caso di antigeni somministrati a scopi vaccinogeni e di molecole degradabili enzimaticamente.

Inoltre il sistema deve essere in grado di inglobare una o più sostanze in modo che dal loro rilascio si ottenga una sufficiente risposta biologica.

Allo scopo è stato sorprendentemente trovato che particolare rilevanza, per la stabilità delle microcapsule e per il rilascio di una o più sostanze biologicamente attive in esse contenute a livello intestinale, come pure per le dimensioni delle microcapsule stesse, hanno opportuni ed inattesi rapporti di concentrazione tra i polisaccaridi alginato/chitosano e ancor più tra i polisaccaridi alginato/chitosano e uno ione divalente nella preparazione delle stesse. Inoltre l'aggiunta di un terzo polimero come l'idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) risulta preferenziale agli scopi della presente invenzione.

L'oggetto della presente invenzione sono quindi microcapsule a doppio strato di polisaccaridi costituite da uno strato esterno di chitosano, uno strato interno di alginato, ottenute:

- da soluzioni di alginato con concentrazioni di partenza comprese tra 2 – 4% p/v;
- da soluzioni di chitosano con concentrazioni di partenza comprese tra 0,1 – 0,5 % p/v;
- da soluzioni di ione divalente con concentrazioni di 0,5 % p/v, quando lo ione divalente è in funzione di gelificante dell'alginato per la formazione di capsule monostrato di alginato inglobanti almeno una sostanza biologicamente attiva e comprese tra 10 – 15% p/v quando lo ione divalente è in funzione stabilizzante delle capsule a doppio strato.

Sono ulteriori oggetti della presente invenzione i) il processo per la preparazione di dette microcapsule, ii) le composizioni per la somministrazione delle stesse ed iii) il loro impiego come veicolo per la somministrazione per via orale di sostanze biologicamente attive per la profilassi e la terapia di malattie infettive o non infettive in campo umano e veterinario.

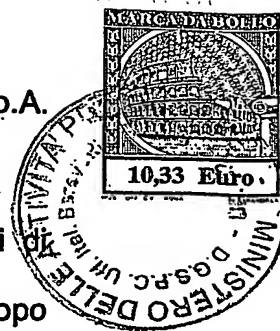
BREVE DESCRIZIONE DELLA FIGURA

Figura 1: A) Foto di microcapsule a doppio strato; B) particolare delle stesse a maggior ingrandimento.

Figura 2: Effetto della variazione della concentrazione di chitosano, alginato, cloruro di calcio e HPMC nel processo di microincapsulazione espressa come percentuale p/v: A) effetto sulla frazione di caricamento, B) effetto sul rilascio totale del lisozima dalla microcapsula.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le caratteristiche e i vantaggi delle microcapsule saranno meglio compresi nel corso della seguente descrizione, in cui tali microcapsule a



doppio strato di chitosano/alginato saranno descritte come esempi di possibili attuazioni. Gli esempi descritti quindi saranno forniti a scopo illustrativo e non limitativo dell'invenzione stessa.

Nella messa a punto di un efficiente sistema di veicolazione per via orale di sostanze biologicamente attive, particolare attenzione è stata dedicata alla scelta dei polimeri per la preparazione delle microcapsule con riguardo alla loro stabilità in ambiente acido ed alla capacità di rilasciare le sostanze biologicamente attive a livello intestinale.

Con riguardo a questo aspetto, tra i polimeri sono stati preferiti polisaccaridi naturali per la loro elevata biocompatibilità e non tossicità, oltre che per le loro proprietà chimico-fisiche e per le loro numerose applicazioni industriali. Allo scopo sono stati scelti il chitosano e l'alginato, polisaccaridi in grado di formare gel in ambiente acquoso e che sono già di largo impiego nell'industria alimentare e farmaceutica. Il chitosano risulta, tra l'altro, adatto per le proprietà mucoadesive e perché permette di ottenere, con opportune tecniche, ad esempio con la tecnica dello *spray dry*, microcapsule di dimensioni $<5\mu\text{m}$ (diametro ottimale per la captazione o *uptake* delle microcapsule a livello della mucosa intestinale). Gli alginati sono attualmente utilizzati in diversi settori farmacologici e biotecnologici con applicazioni che vanno dal rilascio controllato dei farmaci all'incapsulazione di enzimi e/o cellule. È anche noto che l'alginato, in presenza di ioni divalenti, come ad esempio magnesio, zinco e calcio, può formare dei geli che tendono a precipitare in presenza di un eccesso di tali ioni. Agli scopi della presente invenzione lo ione calcio è preferenziale.

Le microcapsule della presente invenzione sono costituite da un doppio strato polimerico, con un rivestimento esterno policationico di chitosano ed un involucro interno polianionico di alginato in cui, qualora aggiunta, la HPMC è interdispersa, il quale involucro interno ingloba almeno una sostanza biologicamente attiva.

Quando lo scopo è la messa a punto di un sistema vaccinogeno la sostanza biologicamente attiva può essere una sostanza biologicamente attiva in grado di indurre una risposta immunitaria, un antigene oppure un antigene associato ad un adiuvante.

Gli antigeni possono essere scelti ad esempio tra: preparazioni con microrganismi uccisi mediante agenti chimici o fisici, preparazioni con mutageni avirulenti selezionati mediante coltura differenziale, preparazioni con tossine svelenate, preparazioni con frazioni batteriche, vaccini sintetici costituiti da specifici epitopi e vaccini anti-virali. Inoltre, in questo caso, a seconda del tipo di risposta che si intende evocare, a questi può essere associato uno specifico adiuvante in grado di incrementarne la risposta biologica.

Il lisozima è una sostanza biologicamente attiva particolarmente interessante per gli scopi della presente invenzione. Infatti il lisozima è una proteina globulare di 14.000 Dalton a carattere fortemente basico di cui sono note da tempo le proprietà antivirali, antibatteriche ed immunomodulanti (*Lysozyme: Model Enzymes in Biochemistry and Biology, edited by P.Jollès.- Birkhäuser 1996*). Inoltre, numerose osservazioni concorrono a definire la concreta possibilità che a livello del sistema linfatico intestinale sia possibile modulare una risposta

immunitaria contro bersagli sistemici mediante lisozima.

Il lisozima da bianco d'uovo di gallina (HEL) rappresenta un antigene ben caratterizzato che, opportunamente processato e presentato in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, può evocare l'attivazione delle risposte mediate dai linfociti T cooperanti (T helper) (*Oki A., Sercarz E. 1985 J. Exp. Med. 161: 897; Allen PM et al. 1984 Proceedings Nat. Acad. Sci. USA; 81: 2489*). In particolare, sono state identificate diverse regioni sulla molecola del HEL capaci di modulare le risposte delle cellule T (*Allen PM et al. 1984 ref. cit*), evidenziando che una molecola MHC di classe II ed una semplice proteina globulare possono generare determinanti multipli o ligandi specifici per il recettore della cellula T (*Allen PM et al. 1985 J. Exp. Med.; 162: 1264*). Corrispondentemente, è utile sottolineare come l'HEL sia stato descritto capace di produrre un quadro di immunostimolazione sistemica, sia in modelli sperimentali (*Reitano S. et al. 1982 Fed. Proceedings 41: 608*) sia in trials clinici nell'uomo (*Cartei F. et al. 1991 Drug Invest. 4 : 51*). Tale quadro è associato, almeno nei mammiferi, ad un'interazione con le placche del Peyer (*Namba Y. Et al. 1981 Infec. & Imm.; 31: 580*).

Per queste sue proprietà il lisozima può essere efficientemente veicolato con le microcapsule dell'invenzione da solo, come sostanza biologicamente attiva, o anche come adiuvante associato a qualsiasi antigene. Quando lo scopo sia, ad esempio, la messa a punto di un sistema vaccinogeno per ottenere una sufficiente risposta immunitaria, qualunque sia l'antigene scelto, risulta infatti preferenziale l'impiego del

lisozima come adiuvante per le sue note proprietà già citate. Non possono comunque essere esclusi altri adiuvanti noti in grado di stimolare le cellule linfocitarie T o B come ad esempio *Mycobacterium* sp., muramil dipeptide, glucani (estratti di lievito), levamisolo, BCG, *Corynebacterium parvum*, polinucleotidi, o lipopolisaccaridi, o mitogeni come le lectine o citochine.

Per scopi terapeutici, invece, le sostanze biologicamente attive possono essere chemioterapici, citochine o fattori di crescita.

E' noto che l'interazione ionica tra chitosano e alginato permette di ottenere la stabilizzazione della struttura di microcapsule con essi preparate, rallentando così il tempo di rilascio, e che la presenza di chitosano conferisce al sistema un certo grado di mucoadesione; ciononostante il problema della dimensione di microcapsule inglobanti una sostanza biologicamente attiva, ma soprattutto della stabilità delle stesse e del rilascio in ambiente acido deve essere considerato con particolare attenzione alla luce dei risultati ottenuti sul rilascio in ambiente acido piuttosto che neutro da Vandenberg G.W. et al. (ref. cit.) e già in precedenza citati. In particolare, per la preparazione di microcapsule in grado di inglobare almeno una sostanza biologicamente attiva, opzionalmente associato ad un adiuvante, in quantità sufficiente ad indurre la risposta biologica voluta e di proteggere gli stessi in ambiente acido e di rilasciarli a livello intestinale, le caratteristiche preferite dei polisaccaridi sono:

- chitosano: polimero in forma idrosolubile, a basso peso molecolare e di circa 150.000 Dalton, con grado di deacetilazione dell'ordine dell'87 %, in



comprese tra 2 – 4 % p/v, in cui detta sostanza è dispersa, per gelificazione con una soluzione di uno ione divalente alla concentrazione di 0,5 % p/v;

b) formazione del secondo strato di chitosano e stabilizzazione della microcapsule a doppio strato ottenute per aggiunta di una soluzione di chitosano in concentrazioni comprese tra 0,1 e 0,5 % p/v e contenenti lo ione divalente in concentrazioni comprese tra 10 – 15 % p/v nella soluzione contenente le capsule monostrato di alginato inglobanti almeno una sostanza biologicamente attiva ottenute in a).

Opzionalmente, nella preparazione delle microcapsule monostrato alla soluzione di alginato può essere aggiunta la HPMC allo 0.4 % p/v.

Nel caso della preparazione delle microcapsule secondo gli esempi di seguito riportati il metodo generale era per emulsione ed era il seguente:

a) Preparazione delle soluzioni:

Soluzione A: CaCl_2 (10, 12, 15 % p/v) era aggiunto a 30 ml di una soluzione di chitosano (0.1, 0.2, 0.5 % p/v), solubilizzato in acqua/acido acetico (0.5 % v/v); la soluzione così ottenuta veniva portata a pH 5.5 con aggiunta di NaOH 1N.

Soluzione B: 1ml di Arlacel 1689 (tensioattivo) era aggiunto a 100 ml di olio di girasole e la soluzione era tenuta in agitazione a 1000 giri/minuto per 10 minuti

Soluzione C: 12 ml di HPMC allo 0.4 % p/v (1 gr in 100 ml di EtOH + 150 ml acqua) venivano aggiunti a 10 gr di soluzione di sodio alginato (2, 3, 4 % p/v); si lasciava in agitazione per circa 5 minuti e successivamente si sonicava per altri 5 minuti;

Soluzione D: 0.1 gr di lisozima e/o 0.1 gr (o meno) di antigene o altre sostanze biologicamente attive erano risospesi in 1 ml d'acqua

Soluzione E: Soluzione di CaCl_2 0.5 % + 1 % Tween 80 in 10 ml d'acqua

b) Emulsione (in agitatore ad albero)

- La soluzione D veniva sospesa nella soluzione C (con o senza HPMC)
- Si teneva in agitazione per 10 minuti
- La sospensione ottenuta si versava goccia a goccia nella soluzione B
- Si lasciava in agitazione per altri 10 minuti a 1000 giri/minuto
- Si aggiungeva lentamente la soluzione E
- Si lasciava in agitazione per 5 minuti a 1000 giri/minuto
- Si aggiungeva la soluzione A
- Si lasciava in agitazione per 1000 giri/minuto
- Disidratazione con 60 ml di isopropanolo sotto agitazione per 5 minuti

c) Isolamento delle microsfere

- L'emulsione ottenuta era centrifugata per 10 minuti a 1100 xg
- Si filtrava sotto vuoto mediante filtri di nitrato di cellulosa con *cut – off* di 0,45 μm e si risciacquava il residuo con isopropanolo.

e) Essiccamento

- Il precipitato era infine asciugato in stufa a 37°C per 24 h.

Alla fine si ottengono delle particelle costituite da un rivestimento esterno di chitosano, ed uno interno di alginato inglobante il lisozima e l'antigene, tra i quali è interdispersa l'HPMC. Con questa procedura è possibile inglobare nella microcapsula una quantità di sostanza pari sino al massimo del 20 % in peso rispetto al totale della microcapsula.

Con il procedimento sopra descritto sono state preparate microcapsule

variando opportunamente i rapporti di chitosano/alginato/calcio cloruro \pm

HPMC secondo lo schema di tabella 1:

Tab. 1

<i>variabili</i>	<i>numero di livelli</i>	<i>livelli</i>
HPMC	2	si/no
chitosano	3	0.1
		0.2
		0.5
alginato	3	2
		3
		4
CaCl ₂	3	10
		12
		15

Con le variabili indicate in tabella la quantità teorica di lisozima microincapsulato è come segue (tabella 2):

Tab.2

<i>Exp</i>	<i>% chitosano</i>	<i>% alginato</i>	<i>% CaCl₂</i>	<i>0.4 % HPMC</i>	<i>lisozima</i>	<i>% lisozima incapsulato*</i>
1	0.1	2	10	+	0.1g	33
2	0.2	3	12	+	"	25
3	0.5	4	15	+	"	20
4	0.1	3	15	-	"	25
5	0.2	4	10	-	"	20
6	0.5	2	12	-	"	33
7	0.1	4	12	+	"	20
8	0.2	2	15	+	"	33
9	0.5	3	10	+	"	25



* % lisozima = grammi di lisozima / (grammi di lisozima + grammi di alginato).

Di seguito sono riportati alcuni esempi di preparazione di microcapsule preparate secondo il procedimento generale in precedenza descritto, in cui i componenti erano combinati tra di loro in rapporti diversi secondo la Tabella 2 e secondo rapporti preferenziali in cui il chitosano è allo 0,1 % p/v, l'alginato è al 4 % e lo ione calcio impiegato in funzione stabilizzante è al 15 % p/v e inglobanti il lisozima e un antigene o solo il lisozima.

Esempio 1: *preparazione per emulsione di microcapsule di chitosano (0.1 % p/v), alginato (4 % p/v) contenenti lisozima (0.1 g) e/o Vibrio anguillarum*

Materiali

- Soluzione acquosa di sodio alginato al 4 % (Pronova): 0,4 g di sodio alginato erano sciolti in 10 ml di acqua
- Soluzione acquosa di HPMC allo 0.4 % p/v (Eigenmann – Veronelli ; Milano) (12 ml): 1 gr di HPMC era sciolta in 100 ml di EtOH e si aggiungevano di seguito 150 ml di acqua.
- Soluzione di CaCl_2 0.5 % + 1 % Tween 80 in acqua (Applied – Science Laboratories Inc) (10 ml)
- Soluzione al 15 % p/v di CaCl_2 anidro (SIGMA): si solubilizzavano 4.5 gr di CaCl_2 in 30 ml d'acqua e si filtrava la soluzione
- Soluzione di chitosano CL 210 allo 0.1 % (Fluka): si aggiungevano 30 mg di chitosano in 30 ml di una soluzione di CaCl_2 anidro al 15 % in modo da avere una concentrazione finale di chitosano allo 0.1 % p/v
- Isopropanolo (BDH, POOL, UK), (60 ml)
- Olio di girasole (ESPERIS S.P.A.), (100 ml)

- Esteri del sorbitolo e del glicerolo (tensioattivo Arlacel 1689, ESPERIS S.P.A.) (10 ml)
- *Vibrio anguillarum* 01 liofilizzato, inattivato al calore (60°C per 15 minuti): 0,05 gr o 0,1 gr di batteri liofilizzati sospesi in 1 ml d'acqua
- Lisozima cloridrato (SPA di Milano) con purezza del 100 %: 0,1 gr di proteina solubilizzati in 1 ml d'acqua.

Procedura

100 ml di olio di girasole con 1 % di Arlacel 1689 erano mescolati mediante agitatore meccanico a 1000 giri/minuto per 10 minuti. A parte, 12 ml di soluzione di HPMC allo 0.4 % p/v si aggiungevano a 10 gr di sodio alginato al 4 % p/v; la soluzione così formata era agitata e successivamente sonicata per 5 minuti ad una frequenza di 97 KHz \pm 6%. Alla miscela, costituita da olio di girasole e tensioattivo, si aggiungeva goccia a goccia la soluzione costituita dall'alginato e dall'HPMC e si sottoponeva ad agitazione per 10 minuti. Alla soluzione di alginato e HPMC si aggiungevano la proteina ed il batterio. In seguito, alla miscela oleosa si aggiungevano lentamente 10 ml di una soluzione allo 0.5 % di CaCl_2 + 1 % di Tween 80 e si lasciava agitare per 5 min. Si aggiungevano quindi 30 ml della soluzione di chitosano allo 0,1 % contenente CaCl_2 in modo da formare Ca – alginato, un composto insolubile che tendeva a precipitare e si lasciava reagire sotto agitazione ancora per 10 minuti. In seguito la miscela veniva disidratata con 60 ml di isopropanolo e lasciata in agitazione per altri 5 minuti. La miscela così ottenuta era centrifugata per 10 minuti a 1100 xg per favorire la precipitazione delle microsfele. Il precipitato era filtrato sotto vuoto

mediante filtri di nitrato di cellulosa con *cut - off* di 0.45 μm e si risciacquava il residuo con isopropanolo. Le microcapsule erano infine asciugate in stufa a 37°C per 24h.

Le microcapsule ottenute sono mostrate in fig. 1.

Esempio 2: *preparazione per emulsione di microcapsule di chitosano (0.2 % p/v), alginato (2 % p/v) contenenti lisozima con aggiunta di HPMC*

STEP 1

- Soluzione A: 4.5 gr di CaCl_2 (15 % p/v) erano aggiunti a 30 ml di una soluzione di chitosano 0.2 % p/v in acqua/acido acetico (0.5 %); la soluzione così ottenuta veniva portata a pH 5.5 con aggiunta di NaOH 1N.
- Soluzione B: in un becker erano messi 100 ml di olio di girasole e 1 ml di Arlacel (surfactante) e la soluzione era tenuta in agitazione a 1000 giri/minuto per 10 minuti (agitatore ad albero)
- Soluzione C: 12 ml di HPMC allo 0.4 % p/v (1 gr in 100 ml di EtOH + 150 ml acqua) erano aggiunti a 10 gr di soluzione di sodio alginato al 2 % p/v; si lasciava in agitazione per circa 5 minuti e successivamente si sonicava per altri 5 minuti;
- Soluzione D: 0.1 gr di lisozima erano risospesi in 1 ml d'acqua
- Soluzione E: 10 ml di CaCl_2 0.5 % e 1 % di Tween 80

STEP 2

Una volta preparate le 4 soluzioni si procedeva con l'aggiunta della soluzione D (lisozima) nella soluzione C di alginato e HPMC e si lasciava agitare finché non si otteneva una sospensione omogenea.

Successivamente la soluzione così ottenuta veniva versata goccia a goccia nella soluzione B sotto agitazione e si lasciava agitare per 10 minuti. Quindi la soluzione E si versava lentamente nel becker e si lasciava in agitazione per 5 minuti. Successivamente si aggiungeva la soluzione A (chitosano e cloruro di calcio) e si lasciava in agitazione per 10 minuti. Infine si versavano 60 ml di isopropanolo e si lasciava in agitazione per 5 minuti. L'emulsione così ottenuta veniva centrifugata per 10 minuti a 1100 xg. Si filtrava sotto vuoto mediante filtri di nitrato di cellulosa con *cut - off* di 0,45 μm e si risciacquava il residuo con isopropanolo. Le microcapsule filtrate si mettevano ad asciugare in stufa per 24 h a 37°C.

Esempio 3: *preparazione per emulsione di microcapsule di chitosano (0.2 % p/v), alginato (4 % p/v) contenenti lisozima senza HPMC*

STEP 1

- Soluzione A: 3 gr di CaCl_2 (10% p/v) erano aggiunti a 30 ml di una soluzione di chitosano 0.2 % p/v solubilizzato in acqua/acido acetico (0.5 %); la soluzione ottenuta veniva portata a pH 5.5 con aggiunta di NaOH
- Soluzione B: in un becker erano messi 100 ml di olio di girasole e 1 ml di Arlacel (surfactante) e la soluzione era tenuta in agitazione a 1000 giri/minuto per 10 minuti (agitatore ad albero)
- Soluzione C: 10 gr di soluzione di sodio alginato al 4 % p/v
- Soluzione D: 0.1 gr di lisozima erano risospesi con 1 ml d'acqua
- Soluzione E: 10 ml di CaCl_2 0.5 % e Tween 80 all'1 %

STEP 2

Una volta preparate le 4 soluzioni si procedeva con l'aggiunta della



soluzione D (lisozima) nella soluzione C di alginato e si lasciava agitare finché non si otteneva una sospensione omogenea. Successivamente la soluzione così ottenuta veniva versata goccia a goccia nella soluzione B sotto agitazione e si lasciava agitare per 10 minuti. Quindi la soluzione E veniva versata lentamente nel becker e si lasciava in agitazione per 5 minuti. Successivamente si aggiungeva la soluzione A (chitosano e cloruro di calcio) e si lasciava in agitazione per 10 minuti. Infine si versavano 60 ml di isopropanolo e si lasciava in agitazione per 5 minuti. L'emulsione così ottenuta veniva centrifugata per 10 minuti a 1100 xg. Si filtrava sotto vuoto mediante filtri di nitrato di cellulosa con *cut – off* di 0.45 μm e si risciacquava il residuo con isopropanolo. Le microcapsule filtrate si mettevano ad asciugare in stufa per 24 h a 37°C.

A scopo comparativo sono state preparate anche microcapsule di solo chitosano o alginato contenenti lisozima o vibrione secondo gli esempi 4 e 5 di seguito riportati.

Esempio 4: *Microsfere di chitosano contenenti lisozima o vibrione*

1 gr di HPMC veniva solubilizzato in 250 ml di etanolo al 50 % (v/v) e venivano aggiunti 0.1 gr di lisozima o di *Vibrio anguillarum*, sospesi in 1 ml d'acqua. La soluzione ottenuta veniva mescolata ad una soluzione contenente 1 gr di chitosano in 100 ml di acqua distillata con lo 0,5 % (v/v) di acido acetico glaciale; si sonicava per 15 minuti e si procedeva allo *spray-drying*. I parametri del processo erano: velocità di flusso 0,25 l/h, temperatura d'entrata 90°C, temperatura d'uscita 60°C, flusso dell'aria 700 NI/h.

Le microsfere di chitosano ottenute erano solubili in una soluzione

acquosa a pH 4-5 (soluzione di acqua/acido acetico 0.5 % o con HCl 1 M)

Esempio 5: Microsfere di alginato contenenti lisozima o vibrione

12 ml di una soluzione acquosa di HPMC allo 0.4 % p/v erano aggiunti a 10 gr di una soluzione acquosa di sodio alginato al 4 % p/v; si lasciava in agitazione per 5 minuti e poi si sonicava per altri 5 minuti. 0.1 gr di lisozima o di *Vibrio anguillarum* precedentemente sospesi in 1 ml d'acqua venivano aggiunti alla soluzione di alginato e HPMC e si lasciava in agitazione fino ad ottenere una sospensione omogenea. Questa miscela era versata goccia a goccia in 100 ml di olio di girasole contenente l' 1 % (v/v) di Arlacel 1689, usando un agitatore meccanico a 1000 giri/minuto per 10 minuti. A questo punto si aggiungevano lentamente 5 ml di una soluzione allo 0.5 % di CaCl_2 + 1 % di Tween 80 e si agitava per 5 minuti. Successivamente si aggiungevano 30 ml di una soluzione contenente CaCl_2 anidro al 15 % e si lasciava reagire sotto agitazione per 10 minuti. Alla miscela si aggiungevano 60 ml di isopropanolo e si lasciava in agitazione per 5 minuti. L'emulsione ottenuta era centrifugata per 10 minuti a 1100 xg. Si filtrava sotto vuoto con filtri di nitrato di cellulosa con *cut-off* di 0,45 μm e si risciacquava il residuo con isopropanolo. Le microcapsule filtrate si mettevano ad asciugare in stufa per 24h a 37°C.

Le microsfere di alginato erano solubili in sodio citrato 0.5 M.

Sulle microcapsule preparate secondo l'esempio 1 è stato quindi determinato il contenuto di lisozima e di antigene ed il rilascio del lisozima a diversi pH come di seguito descritto, in confronto con

microcapsule di esempio 4 e 5.

Esempio 6: determinazione del contenuto di lisozima e di antigene

Campioni di microcapsule contenenti sia lisozima che vibrione sono stati solubilizzati ed in seguito, dopo aver eliminato gli alginati dalla soluzione mediante precipitazione, è stato determinato il contenuto totale di lisozima e *Vibrio anguillarum* con tecniche di immunoprecipitazione (test ELISA) e mediante dosaggio proteico con reattivo di Bradford; soltanto per la determinazione della quantità di lisozima è stata impiegata anche l'analisi cromatografica HPLC.

Precipitazione degli alginati

I campioni di microsfeere a singolo strato di alginato sono stati solubilizzati in sodio citrato 0.5 M mentre per quelle a doppio strato di chitosano-alginato è stato necessario prima solubilizzare il chitosano in acido acetico 0.5 % o HCl 1 N. In seguito, per far precipitare gli alginati, veniva aggiunto un volume 2/3 volte superiore di alcool (isopropanolo). Dopo una centrifugazione per 10 minuti a 550 xg a 4°C, si osservava la formazione di un *pellet* flocculoso bianco. Si recuperava la soluzione alcolica sopranatante, contenente la proteina solubilizzata e, poiché l'alcool interferiva nelle analisi, si procedeva alla dialisi della soluzione. Erano utilizzate membrane di dialisi con *cut-off* di 12000 Dalton.

La dialisi dei campioni era condotta in un recipiente contenente acqua distillata, preferibilmente sotto agitazione, per un tempo minimo di 24 h.

Al termine si prelevava il dializzato, registrando il volume ottenuto dei singoli campioni, e si concentrava eventualmente la soluzione recuperata fino all'ottenimento di un volume ottimale per l'analisi da effettuare.

a) Test ELISA

La quantità totale di lisozima e *Vibrio anguillarum* era determinata con il test ELISA, utilizzando rispettivamente anticorpo di coniglio antilisozima e antivibrione biotinilati. Sono state preparate: le soluzioni di lisozima e vibrione, disciolti in acqua distillata per effettuare la curva di calibrazione e le soluzioni dei campioni in esame, solubilizzati nei corrispettivi solventi.

Una piastra da 96 pozzetti in polistirene per ELISA è stata rivestita con 2 µg / pozzetto (per un volume totale di 200 µl per pozzetto) di antigene diluito in tampone bicarbonato 0.1 M a pH 9.6. La piastra era incubata per una notte a 4°C. Si rimuoveva l'eccesso di antigene e successivamente la piastra era lavata tre volte con PBS/Tween 20 (0.1 %). Dopo il blocco della piastra eseguito con latte scremato al 2 % p/v in PBS per 1 h a 37°C e successivi lavaggi con PBS/Tween 20, seguiva l'incubazione a 37°C per 1 h con l'anticorpo antilisozima (1:1000) o antivibrione (1:100) biotinilati. Infine la piastra, dopo tre ulteriori lavaggi, era incubata per 30 minuti a 37°C con streptavidina coniugata alla fosfatasi alcalina, diluita 1:1000 e successivamente con il substrato per la fosfatasi p-nitrofenilfosfato (PNPP) alla concentrazione di 1.0 mg/ml in tampone glicina a pH 10.4. Le letture sono state effettuate ad intervalli regolari di tempo a 405 nm utilizzando lo spettrofotometro BS 1000 Packard.

b) Dosaggio proteico con reattivo di Bradford

La concentrazione di proteine batteriche o di lisozima nelle microcapsule è stata determinata con il metodo descritto da Bradford che permette un



dosaggio fino a 10 $\mu\text{g/ml}$. Per effettuare le curve di calibrazione sono state preparate le soluzioni standard di BSA [1 mg/ml], utilizzata come controllo positivo e le soluzioni di lisozima e vibrione [1 mg/ml], disciolti in acqua, in sodio citrato 0.5 M e in acqua/acido acetico, come riferimento per i campioni esaminati. I campioni per lo studio di chitosano-lisozima sono stati solubilizzati in acqua/acido acetico (0.5 %), le microsfere di alginato sono state disciolte in sodio citrato 0.5 M e mentre per quelle a doppio strato di chitosano-alginato è stato necessario prima solubilizzare il chitosano in acido acetico 0.5 % o HCl 1N. In una piastra da 96 pozzetti, a 40 μl di campioni in esame, opportunamente diluiti, sono stati aggiunti 200 μl di miscela di Bradford. Le letture spettrofotometriche erano effettuate a 590 nm con un lettore di piastra per ELISA (BS 1000 SpectraCount, Packard).

c) determinazione mediante HPLC.

La soluzione madre di lisozima è stata ottenuta solubilizzando 10 mg in 1 ml di miscela acqua/acido acetico 0,5 % per lo studio delle microcapsule di chitosano-lisozima; le microcapsule di alginato-lisozima sono state solubilizzate in sodio citrato 0.5 M e per quelle a doppio strato di chitosano-alginato è stato necessario prima solubilizzare il chitosano in acido acetico 0.5 % o HCl 1N. Dopo precipitazione degli alginati mediante isopropanolo, le soluzioni alcoliche sono state dializzate in acqua e successivamente analizzate. Tali soluzioni sono state utilizzate giornalmente per preparare la curva di taratura alla concentrazione di 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. I campioni in esame, ossia i polimeri puri e le microcapsule vuote o contenenti lisozima, erano disciolti in acqua/acido

acetico 0,5 %.

Una volta diluiti nella fase mobile, 50 µl dei campioni sono stati iniettati (loop d'iniezione) in colonna. La concentrazione di lisozima nelle microcapsule è stata determinata all'UV ad una lunghezza d'onda di 280 nm, corrispondente al massimo di assorbimento dell'analita considerato.

L'analisi cromatografica è stata eseguita con una fase mobile costituita da una miscela di acido trifluoroacetico in acetonitrile (0.1 %) e acido trifluoroacetico in acqua (0.1 %) in rapporto 1 : 3. E' stata utilizzata una velocità di flusso di 1.2 ml/minuto.

Per la valutazione della validità del metodo sono stati calcolati la linearità, la ripetibilità, la riproducibilità e la sensibilità, che hanno fornito risultati ottimali.

Tabella 3: frazione di caricamento effettiva, espressa in percentuale, del lisozima nelle microcapsule rispetto alla percentuale attesa.

Campioni	dosaggio proteico con Bradford (% carico)	Test ELISA (% carico)	HPLC (% carico)
Microcapsule a singolo strato			
es. 4 chitosano-lisozima	94	-	88
es. 4 chitosano-vibrione	88	84	-
es.5 alginato-lisozima	37	-	23
es. 5 alginato-vibrione	44	36	-
Microcapsule a doppio strato			
es. 1 chitosano-alginato lisozima	96	95	86
es. 1 chitosano-alginato vibrione	22	21	-
es. 1 chitosano-alginato lisozima+vibrione	30	-	-

Esempio 7: Rilascio di lisozima a diversi pH

Le microcapsule erano sospese in tamponi a pH 3 e 5.5 ed erano tenute in agitazione a 37°C per 24h. Ad intervalli di tempo predeterminati, le sospensioni erano quindi centrifugate per 5 minuti e dal surnatante era prelevata un'aliquota per effettuare un dosaggio proteico con reattivo di Bradford. Al termine di tale incubazione, si centrifugavano i 2 campioni, si prelevava il surnatante ed i campioni erano risospesi in tampone a pH 8 per le 24 h successive. In questo modo si simulava una lunga permanenza in ambiente acido (stomaco) seguita dalla permanenza in ambiente alcalino (intestino). I risultati ottenuti indicavano che a pH 3 e a pH 5 il rilascio di lisozima dopo 24 h era rispettivamente del 3.0 % e 3.2 % (analoghi calcoli effettuati mediante HPLC hanno dato rispettivamente 2.4 % e 3.6 %). Al contrario, la permanenza in ambiente alcalino ha portato al rilascio di circa 60 % del lisozima, indipendente dal fatto che la soluzione partisse da pH 3 o da pH 5.5 (tab.4).

Tabella 4: Percentuale di lisozima rilasciato dalle microcapsule di esempio 1, 4, 5 dopo 24 h di incubazione a pH 3 e pH 5.5 e dopo successive 24 h di incubazione a pH 8 e determinata mediante dosaggio proteico con reattivo di Bradford

	pH3	pH 5.5	pH3-pH8	pH5.5-pH8
	% rilascio	% rilascio	% rilascio	% rilascio
Es 1: chitosano-alginato lisozima	3.0	3.2	60.0	60.0
Es.4: chitosano lisozima	70.0	80.0	-	-
Es.5: alginato lisozima	3.0	4.0	70.0	70.0

Anche sulle microcapsule, in cui i componenti erano combinati tra di loro in rapporti di concentrazione diversi rispetto alle microcapsule di esempio 1 e corrispondenti a quanto riportato in tab.2, sono stati valutati gli effetti ai fini del caricamento e del rilascio del lisozima.

Esempio 8: *effetti sul caricamento e sul rilascio del lisozima della variazione della concentrazione dei componenti espressa come % in p/v (chitosano, alginato, calcio cloruro e HPMC)*

Il caricamento effettivo ottenuto era valutato nel seguente modo:

1 mg di campione era solubilizzato in acqua/acido acetico (0.5 %) o HCl 1 M per facilitare la solubilizzazione del chitosano e poi in sodio citrato 0.5 M. I campioni venivano quindi sonicati ripetutamente, fino alla completa scomparsa di particelle in sospensione. Dopo la completa solubilizzazione, veniva aggiunto un volume 2/3x superiore di isopropanolo per far precipitare l'alginato. La soluzione era quindi centrifugata per 10 minuti a 550 xg a 4°C e il surnatante era recuperato e messo a dializzare in acqua per 24h, in membrane di dialisi con *cut-off* di 12000 Dalton. I campioni dializzati erano recuperati, misurando il volume ottenuto, e analizzati con dosaggio proteico con reattivo di Bradford e HPLC come già descritto in precedenza. I risultati riportati in tabella 5, ottenuti mediante HPLC sono espressi in μg di lisozima.

Tab.5

<i>microcps</i>	<i>µg tot teorici</i>	<i>µg ottenuti</i>	<i>% carico</i>
1	330	50.5	15.3
2	250	56.3	22.5
3	200	44.5	22.2
4	250	40.7	16.3
5 (Es. 3)	200	27.1	13.5
6	330	16.0	4.8
7	200	19.4	9.7
8 (Es. 2)	330	29.2	8.8
9	250	61.3	24.5

Il rilascio del lisozima dalle microcapsule è stato valutato a diversi pH passando da ambiente acido ad ambiente basico per simulare le condizioni presenti nello stomaco e a livello intestinale secondo la seguente metodica:

5 mg di microcapsule erano sospesi in 5 ml di tampone glicina/HCl a pH 3; la sospensione era tenuta in agitazione a 37°C per almeno 24h. Ogni 2 h era prelevata un'aliquota e, dopo aver centrifugato i campioni per 5 minuti a 550 xg, era effettuato un dosaggio proteico con reattivo di Bradford, su curva standard di lisozima in acqua. Dopo 24h circa si centrifugavano i campioni per 5 minuti a 550 xg e si recuperava il surnatante. Le microcapsule precipitate erano risospese in 5 ml di tampone fosfato a pH8 e tenute in agitazione a 37°C per almeno 24h. Ogni 2 h era prelevata un'aliquota e, dopo aver centrifugato i campioni per 5 minuti a 550 xg, era effettuato un dosaggio proteico con reattivo di Bradford, su una curva standard di lisozima in acqua. Per effettuare

l'analisi cromatografica con l'HPLC, era necessario dializzare la soluzione in acqua, per eliminare il tampone fosfato. In tabella 6 sono riportati i dati relativi al rilascio dopo 24 h a pH 3 e a pH 8.

Tab.6

<i>Micro capsule</i>	<i>µg liso tot</i>	a pH3		pH3 pH8	
		<i>µg rilasciati</i>	<i>% rilascio</i>	<i>µg rilasciati</i>	<i>% rilascio</i>
1	252.5	16.0	6.3	216.7	85.8
2	281.5	17.9	6.3	60.6	21.5
3	222.5	26.9	12.1	109.1	49.0
4	203.5	12.0	5.9	128.3	63.0
5 (Es. 3)	135.5	12.1	8.9	96.0	70.8
6	80.0	10.2	12.7	76.0	95.0
7	97.0	23.5	24.2	64.5	66.5
8 (Es. 2)	146.0	20.3	13.9	32.5	22.3
9	306.5	22.0	7.2	73.1	23.8

Nelle condizioni sperimentali sopra citate è stata verificata anche l'influenza della HPMC, ottenendo i risultati riportati nella figura 2.

Dall'analisi della figura 2 è possibile stabilire i livelli delle variabili che maggiormente influenzano le due caratteristiche delle microcapsule prese in esame, ossia sulla % di caricamento e sulla % di rilascio della proteina o dell'antigene.

Per quanto riguarda la % di caricamento si evince che quest'ultima risulta massima nella formulazione contenente HPMC, lo 0.5 % di chitosano, il 3 % di alginato e il 10 % di CaCl₂.

Mentre, per quanto riguarda la % di rilascio, questa viene ritardata per la presenza dei seguenti fattori: HPMC, del 0.2 % di chitosano, del 3 % di alginato e del 15 % di CaCl_2 ; mentre si riscontra un suo incremento, quando l'HPMC non è presente, il chitosano è del 0.5 %, l'alginato è del 2 % e il CaCl_2 è del 12 %.

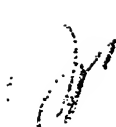
Per le microcapsule ottenute all'esempio 1 inglobanti lisozima e vibrione o solo lisozima e solo vibrione sono state anche confrontate alcune caratteristiche (diametro, solubilità e grado di rigonfiamento) con microcapsule di solo chitosano o di solo alginato preparate secondo gli esempi 4 e 5.

Esempio 9: Caratterizzazione delle microcapsule di esempio 1, 4, 5

Diametro medio

La determinazione della distribuzione particellare e del diametro medio delle microcapsule è stata realizzata tramite l'impiego della tecnica dell'analisi dell'immagine, utilizzando un microscopio ottico (Olympus BH-2), collegato con un sistema computerizzato (Optomax-W, Cambridge).

Le microcapsule di chitosano, contenenti lisozima, presentavano un diametro medio di 3 μm , riscontrato anche per quelle con *Vibrio anguillarum*, mentre le microsfele di alginato avevano un diametro medio di 7 μm , relativamente a quelle contenenti lisozima, e di 8 μm , in quelle con vibrione. Le microcapsule costituite da un doppio strato di chitosano e alginato mantenevano le dimensioni necessarie alla captazione a livello intestinale (diametro < 10 μm) (tabella 7).



Grado di rigonfiamento

Utilizzando sempre la tecnica dell'analisi dell'immagine, è stata valutata la tendenza al rigonfiamento delle microcapsule, poste in acqua per 12h, dovuto parzialmente al richiamo del liquido ad opera del polimero e di HPMC, contenuto nella preparazione. Successivamente è stata misurata la distribuzione del diametro particellare delle microsfeere "rigonfiate" e l'aumento osservato per le diverse microsfeere era dell'entità di circa 2 μm , valore che rientra comunque nei limiti richiesti.

Solubilità

Come indicato in tabella 7 le microcapsule di chitosano erano solubili in soluzione acida a pH 4-5 di acqua/acido acetico (0.5 %) o in acido cloridrico 1M, mentre le microcapsule di alginato si solubilizzavano in sodio citrato 0.5M. Le microcapsule a doppio strato erano solubilizzate in acqua/acido acetico (0.5%) o HCl1M per facilitare la solubilizzazione del chitosano e poi in sodio citrato 0.5M.

Tab.7

Campioni	Diametro medio (μm)	Solubilità
Microcapsule a singolo strato		
es. 4 chitosano-lisozima	3	acqua/ac.acetico o HCl 1M
es. 4 chitosano-vibrione	3	acqua/ac.acetico o HCl 1M
es.5 alginato-lisozima	7	sodio citrato 0.5M
es. 5 alginato-vibrione	8	sodio citrato 0.5M
Microcapsule a doppio strato		
es. 1 chitosano-alginato lisozima	5	acqua/ac.acetico o HCl 1M - sodio citrato 0.5M
es. 1 chitosano-alginato vibrione	5	acqua/ac.acetico o HCl 1M - sodio citrato 0.5M
es. 1 chitosano-alginato lisozima+vibrione	5	acqua/ac.acetico o HCl 1M - sodio citrato 0.5M



Esempio 10: Attivazione del sistema immunitario in vivo

La valutazione della capacità della microcapsula di esempio 1 a doppio strato di veicolare l'antigene e l'adiuvante nel sistema immunitario dell'animale dopo somministrazione orale è stata effettuata su un modello murino utilizzando topi CBA femmine, ai quali le microcapsule sono state somministrate attraverso il mangime. In breve, microcapsule a doppio strato contenenti lisozima e/o vibrione, corrispondenti in peso alla somministrazione di 2 mg/kg/die di lisozima e 1mg (1.5×10^9 cellule) di vibrione/topo/die, sono state mescolate con mangime in polvere e somministrate a gruppi di animali preventivamente condizionati all'alimentazione con il mangime in questione. Per controllo sono stati utilizzati gruppi trattati con lisozima o con vibrione liberi o con microcapsule contenenti rispettivamente solo lisozima o solo vibrio. Il trattamento di immunizzazione è stato protratto per 6 giorni consecutivi in gruppi di 5 animali.

Tab.8

Gruppi	IgM dopo immunizzazione	
	24h	7gg
Anticorpi anti-lisozima		
controlli	432±69	478±49
lisozima	743±69*	836±141
chito/alg-lisozima	824±25*	592±150
chito/alg-liso/vibrione	1291±104**	616±56
Anticorpi anti-vibrione		
controlli	548±126	508±55
vibrione	762±142	512±128
chito/alg-vibrione	1192±138*	619±100
chito/alg-lisozima/vibrione	1417±192*	890±74*

Tabella 8. Anticorpi misurati mediante test Elisa nei sieri degli animali testati dopo prelievo di piccoli campioni di sangue dalla tasca guancia. Ciascun valore riportato è la media \pm E.S. di misure da 5 animali differenti. I dati riportati in tabella 8 mostrano chiaramente che la microcapsula a doppio strato, caricata con adiuvante (lisozima) e antigene (vibrione) è capace di dare una stimolazione delle risposte immunitarie, misurate dalla quantità di IgM rilasciate, decisamente superiore a quella ottenuta con il caricamento di un singolo componente, sia nel caso di anticorpi anti-lisozima, sia nel confronto di quelli anti-vibrione. L'effetto è decisamente molto più marcato se si confronta con la somministrazione del lisozima e del vibrione non microincapsulati. *: $p < 0.05$, **: $P < 0.01$, analisi della varianza: Anova e Student Newmann Keuls post test

Le microcapsule oggetto dell'invenzione, aventi un diametro inferiore a 10 μ m, formate da uno strato interno di alginato che contiene l'antigene corpuscolato da veicolare al sistema immunitario mediante somministrazione per via orale ed uno esterno di chitosano che garantisce proprietà mucoadesive alla parete dell'intestino, risultano efficaci a distribuire al sistema immunitario mucosale l'antigene e il coadiuvante, rappresentato nel caso illustrato dal lisozima (tabella 8). Lo studio dimostra che le microcapsule a doppio strato, così come vengono proposte, sono anche in grado di proteggere l'antigene dagli effetti degradanti nello stomaco degli animali trattati, risultando resistenti alla degradazione a pH acido e facilitando, al contrario, il rilascio del proprio contenuto a pH alcalino, così come si presenta nella prima parte dell'intestino che, sia nel caso dei mammiferi sia in quello dei pesci, è

ricco di organi linfoidei.

Le microcapsule dell'invenzione possono quindi essere utilmente impiegabili come veicoli di sostanze biologicamente attive a scopi vaccinogeni per la profilassi e terapia di patologie infettive e non infettive o a scopi terapeutici delle stesse in campo umano o veterinario.

Le microcapsule oggetto dell'invenzione possono essere somministrate in composizioni con opportuni eccipienti o diluenti accettabili in campo farmaceutico o alimentare e per l'impiego previsto e nelle forme opportune allo scopo come forme solide (polveri, compresse, capsule), o in forme liquide (soluzioni oleose o acquose) sia per dosaggio multiplo che in monodose.

In particolare, in campo veterinario, nella zootecnia o nell'itticoltura, le microcapsule dell'invenzione possono anche essere somministrate in forma di polveri miscelate con i mangimi impiegati per l'alimentazione degli animali.

RIVENDICAZIONI

1. Microcapsule a doppio strato di polisaccaridi costituite da uno strato esterno di chitosano, uno strato interno di alginato caratterizzate dal fatto che sono ottenute:

- da soluzioni di alginato con concentrazioni di partenza comprese tra 2 – 4 % p/v;
 - da soluzioni di chitosano con concentrazioni di partenza comprese tra 0,1 – 0,5 % p/v;
 - da soluzioni di uno ione divalente con concentrazioni di 0,5 % p/v, quando lo ione divalente è in funzione di gelificante dell'alginato per la formazione di capsule monostrato di alginato inglobanti almeno una sostanza biologicamente attiva e comprese tra 10 – 15 % p/v quando lo ione divalente è in funzione stabilizzante delle capsule a doppio strato.
- per uso come veicoli per la somministrazione per via orale di dette sostanze biologicamente attive.

2. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 in cui alle soluzioni di partenza dell'alginato è disperso un ulteriore polimero, l'idrossipropilmetilcellulosa, alla concentrazione di partenza di 0,4 % p/v.

3. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 in cui la concentrazione di partenza dell'alginato è al 4 % p/v e la concentrazione di partenza del chitosano è allo 0,1 % p/v e quella dello ione divalente in funzione stabilizzante le microcapsule a doppio strato è al 15 % p/v.

4. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 in cui lo ione divalente è il calcio.

5. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 in cui le sostanze



biologicamente attive sono scelte tra immunomodulanti, antigeni, chemioterapici, citochine, fattori di crescita.

6. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 in cui alla sostanza biologicamente attiva è associato un adiuvante per incrementarne la risposta biologica.

7. Microcapsule secondo la rivendicazione 1 e 6 in cui la sostanza biologicamente attiva o l'adiuvante è il lisozima.

8. Microcapsule a doppio strato di polisaccaridi costituite da uno strato esterno di chitosano, uno strato interno di alginato caratterizzate dal fatto di essere ottenute per:

a) formazione di capsule monostrato inglobanti almeno una sostanza biologicamente attiva a partire da soluzioni di alginato in concentrazioni comprese tra 2 - 4 % p/v, in cui detta sostanza è dispersa, per gelificazione con una soluzione di uno ione divalente alla concentrazione di 0,5 % p/v;

c) formazione del secondo strato di chitosano e stabilizzazione della microcapsule a doppio strato ottenute per aggiunta di una soluzione di chitosano in concentrazioni comprese tra 0,1 e 0,5 % p/v e contenenti lo ione divalente in concentrazioni comprese tra 10 - 15 % p/v nella soluzione contenente le capsule monostrato di alginato inglobanti detta sostanza ottenute in a)

per uso come veicoli per la somministrazione per via orale di dette sostanze biologicamente attive.

9. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 in cui alle soluzioni di partenza dell'alginato è disperso un ulteriore polimero,

l'idrossipropilmetilcellulosa, alla concentrazione di partenza di 0,4 % p/v.

10. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 in cui la concentrazione di partenza dell'alginato è al 4 % p/v e la concentrazione di partenza del chitosano è allo 0,1 % p/v e quella dello ione divalente in funzione stabilizzante le microcapsule a doppio strato è al 15 % p/v.

11. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 in cui lo ione divalente è il calcio.

12. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 in cui le sostanze biologicamente attive sono scelte tra immunomodulanti, antigeni, chemioterapici, citochine, fattori di crescita.

13. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 in cui alla sostanza biologicamente attiva è associato un adiuvante per incrementarne la risposta biologica.

14. Microcapsule secondo la rivendicazione 8 e 13 in cui la sostanza biologicamente attiva o l'adiuvante è il lisozima.

15. Uso delle microcapsule secondo una delle rivendicazioni da 1 a 14 per la preparazione di composizioni per la somministrazione per via orale di almeno una sostanza biologicamente attiva a scopi vaccinogeni o terapeutici per la profilassi o la terapia di malattie infettive o non infettive in campo umano e veterinario.

16. Uso delle microcapsule secondo la rivendicazione 15 per la profilassi o la terapia nel campo della zootecnia e della ittiocoltura.

17. Composizioni di microcapsule secondo una delle rivendicazioni da 1 a 14 in formulazioni adatte per la somministrazione orale scelte tra forme solide, come polveri, compresse, capsule, o forme liquide, come



soluzioni oleose o acquose, sia per dosaggio multiplo che in monodose con eccipienti o diluenti accettabili dal punto di vista farmaceutico e alimentare in campo umano e veterinario.

18. Processo per la preparazione di microcapsule a doppio strato di polisaccaridi costituite da uno strato esterno di chitosano, uno strato interno di alginato caratterizzato dal fatto di comprendere le seguenti fasi:

a) formazione di capsule monostrato inglobanti una sostanza biologicamente attiva a partire da soluzioni di alginato in concentrazioni comprese tra 2 – 4 % p/v, in cui detta sostanza è dispersa, per gelificazione con una soluzione di uno ione divalente alla concentrazione di 0,5 % p/v;

b) formazione del secondo strato di chitosano e stabilizzazione della microcapsule a doppio strato ottenute per aggiunta di una soluzione di chitosano in concentrazioni comprese tra 0,1 e 0,5% p/v nella soluzione e contenenti lo ione divalente in concentrazioni comprese tra 10-15 % p/v nella soluzione contenente le capsule monostrato di alginato inglobanti detta sostanza ottenute in a).

19. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui alle fasi a) e b) è aggiunta la fase c) di disidratazione, isolamento ed essiccazione delle microcapsule ottenute.

20. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui alle soluzioni di partenza dell'alginato è disperso un ulteriore polimero, l'idrossipropilmetilcellulosa, alla concentrazione di partenza di 0,4 % p/v.

21. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui la concentrazione di partenza dell'alginato è al 4 % p/v e la concentrazione di partenza del chitosano è allo 0,1 % p/v e quella dello ione divalente in funzione stabilizzante le microcapsule a doppio strato è al 15 % p/v.

22. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui lo ione divalente è il calcio.

23. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui le sostanze biologicamente attive sono scelte tra immunomodulanti, antigeni, chemioterapici, citochine, fattori di crescita.

24. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui alla sostanza biologicamente attiva è associato un adiuvante per incrementarne la risposta biologica.

25. Processo per la preparazione di microcapsule secondo la rivendicazione 18 in cui la sostanza biologicamente attiva o l'adiuvante è il lisozima.

Milano, li 6 Agosto 2003

p. FONDAZIONE CARLO E DIRCE CALLERIO ONLUS

Il Mandatario


Dr. Diego Pallini

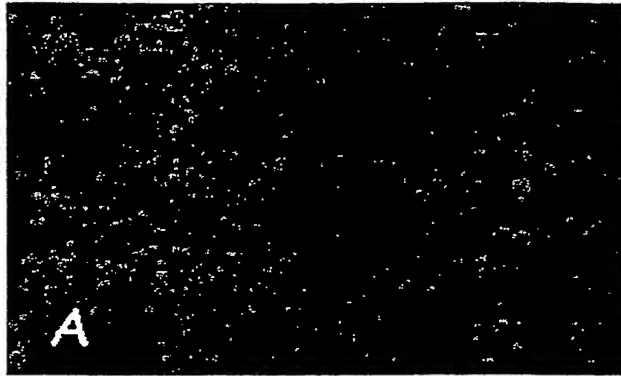
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



Stella



Figura 1



A. Foto di microcapsule a doppio strato



B. particolare delle stesse a maggior ingrandimento

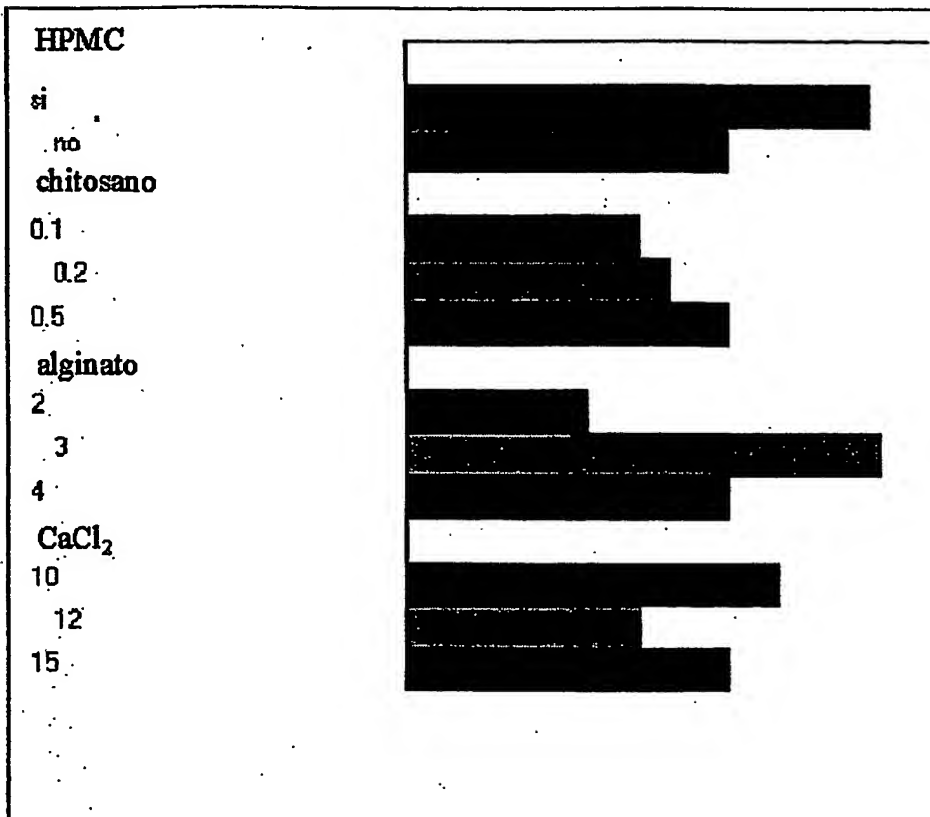
2003A00161Z

Stella

G. Min

Figura 2

A) Effetti sul caricamento



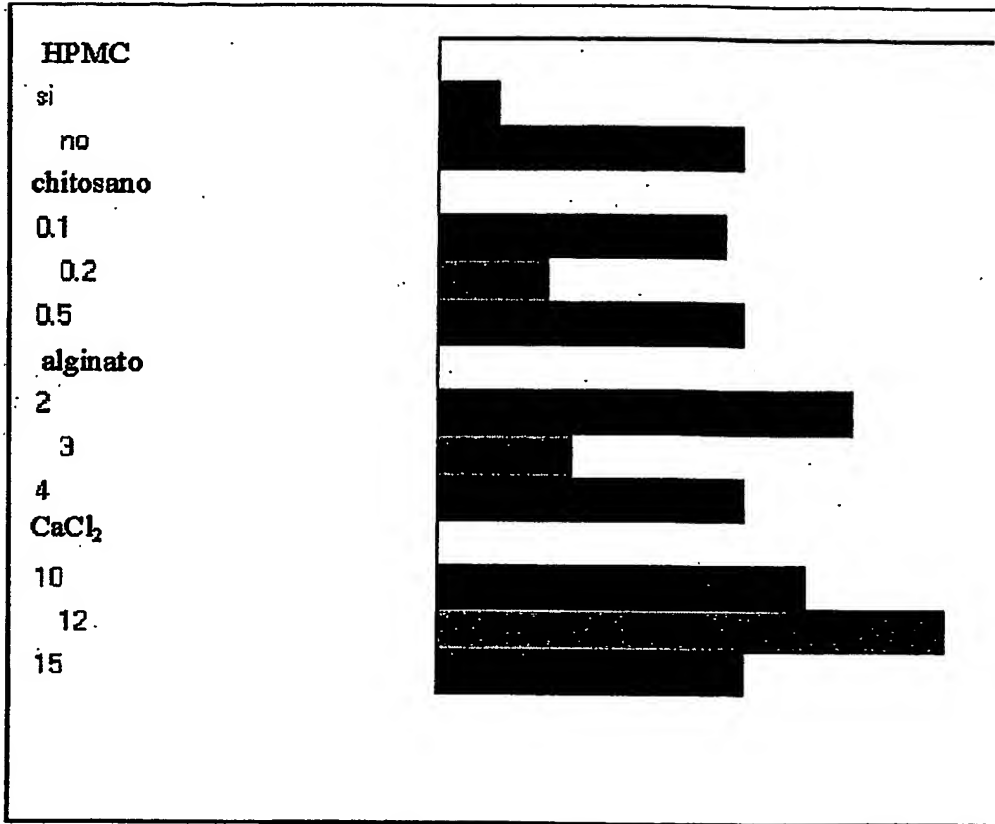
x = livelli; y = % caricamento

2003A0016117

eg

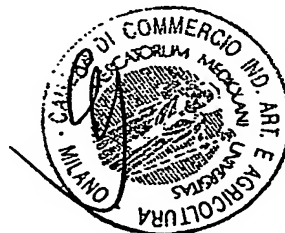
Notarbartolo

B) Effetto sul rilascio



x = livelli; y = % rilascio

2003A00164



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.